



SUR LA
DIALYSE DES ENZYMES

PAR LE

Dr NIKITA CHODSCHAJEW (KHODJAEFF)



SUR LA
DIALYSE DES ENZYMES

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

de

l'Université de Fribourg (Suisse)

pour

obtenir le grade de Docteur ès-Sciences

par

Nikita Chodschajew (Khodjaeff)

de Piatigorsk (Russie).



Fribourg (Suisse)
Imprimerie Fragnière Frères

1898

Ce travail a été fait à l'Institut de physiologie de l'Université de Fribourg (Suisse), sur les conseils et sous la direction de M. le professeur Arthus.

Je prie M. le professeur Arthus d'agréer mes remerciements pour l'hospitalité qu'il m'a accordée dans son laboratoire pendant le semestre d'été 1897 et le semestre d'hiver 1897-98.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SUR LA DIALYSE DES ENZYMES

Les phénomènes de fermentations par enzymes qui s'accomplissent dans l'organisme des êtres vivants sont intéressants à considérer, parce qu'ils constituent une transition entre les phénomènes d'ordre physico-chimique et les phénomènes vitaux de l'économie.

Ces phénomènes, qui s'accomplissent dans l'organisme peuvent également s'accomplir hors de l'organisme ; leur agent déterminant n'est pas, en effet, un élément vivant, et par conséquent ces phénomènes doivent être nettement séparés de ceux qui sont en rapport direct avec la vitalité des cellules. Mais les agents de ces fermentations, les enzymes, dérivent des cellules vivantes : aucun biologiste, aucun chimiste n'a pu engendrer *in vitro*, au moyen d'éléments non organisés et non vivants, une quantité même infiniment petite d'enzyme. Seule, la cellule vivante peut produire les enzymes ; et par conséquent si, d'une part, il faut nettement séparer les enzymes de la cellule vivante génératrice, il faut, d'autre part, établir une relation entre l'enzyme et la cellule vivante, car toute enzyme dérive nécessairement d'une cellule vivante.

L'étude des fermentations par enzymes est importante et intéressante parce qu'elle permet de connaître l'une des manifestations indirectes de l'activité vitale. Cette étude, plutôt biologique que chimique, réalisable en dehors de l'organisme vivant, nous fait pénétrer, dans une certaine mesure, dans la connaissance des phénomènes dépendant de l'activité vitale, en attendant qu'elle nous conduise progressivement à la connaissance des manifestations à proprement parler vitales du protoplasma.

Toute étude sur les enzymes, quelque modeste qu'elle soit, présente de l'importance parce qu'elle augmente la somme de nos connaissances sur ces agents encore mystérieux, dont la constitution, la composition, les affinités et la nature nous sont presque absolument inconnues.

On peut même admettre que toute étude sur les enzymes présente un intérêt pratique, car les recherches poursuivies depuis quelques années sur les produits toxiques engendrés par les microbes tendent à rapprocher ces toxines des enzymes. On peut donc penser que les faits mis en évidence sur les enzymes pourront être généralisés et étendus aux toxines, aux antitoxines, aux venins, etc.

Ces considérations m'ont conduit à rechercher si, parmi les indications que nous possédons sur les enzymes, il n'y en aurait pas quelqu'une qui, incertaine, douteuse, mal posée, ne mériterait pas d'être méthodiquement étudiée.

J'ai pensé qu'il serait utile de rechercher si les enzymes peuvent dialyser à travers les membranes de papier parchemin et comment elles dialysent.

Ce sont les résultats de ces recherches que je me propose d'exposer dans ce mémoire.

La question de la dialyse des enzymes n'est pas absolument neuve. Plusieurs auteurs ont fourni quelques indi-

cations se rattachant à cette question, mais personne n'en a fait une étude méthodique. Von Wittich (*Weitere Mittheilungen über Verdauungsfermente. — Das Pepsin und seine Wirkungen auf Blutfibrin. — Pflüger's Archiv. Vol. V, p. 435, 1872*) rapporte les expériences qu'il a faites incidemment sur la dialyse de la pepsine. — La pepsine, dit-il, partage avec les substances albuminoïdes la propriété d'être presque complètement indiffusible.

Si, dans un dialyseur plongeant dans l'eau, on introduit une solution glycinée de pepsine, on constate au bout de plusieurs jours que le liquide extérieur acidulé ne possède aucune propriété peptique appréciable ; tandis que le liquide intérieur est doué après acidulation d'un pouvoir peptique sensiblement égal à celui de la solution glycinée primitive. Au contraire, la pepsine dialyserait facilement et rapidement si le liquide extérieur dans lequel plonge le dialyseur est de l'acide chlorhydrique à 2 pour 1000 et non plus de l'eau. Von Wittich admet pour expliquer cette différence que la pepsine forme avec l'acide chlorhydrique une combinaison dialysable (*Chlorpepsinwasserstoffsäure*).

Von Wittich signale enfin le fait suivant qu'il a observé. Si la dialyse de la solution glycinée de pepsine se fait en présence d'eau dans laquelle sont immergés des flocons de fibrine, on constate :

1° L'eau extérieure débarrassée des flocons de fibrine n'a acquis aucun pouvoir peptique capable de se manifester par son action sur la fibrine après acidulation ;

2° Les flocons de fibrine, au contraire, plongés dans cette eau extérieure se sont chargés de pepsine, car si on les introduit dans une solution d'acide chlorhydrique à 2 pour 1000, on les voit se digérer avec une grande rapidité. Von Wittich explique ces faits en tenant compte de la propriété que possède la fibrine d'absorber les enzymes : la pepsine

n'est pas absolument indialysable ; si, dans le liquide extérieur, sont plongés des flocons de fibrine capables d'absorber les traces de pepsine qui ont dialysé, de nouvelles traces de pepsine dialyseront, et finalement, grâce à cet enlèvement incessant de la pepsine par la fibrine, une quantité relativement considérable d'enzyme aura traversé la membrane de l'appareil dialyseur.

Hammarsten (*Ueber die Indiffusibilität des Pepsins*, analyse faite par Hammarsten de son travail : *Om pepsinets indiffusibilitet* — *Upsala läkareförenings förhandlingar*, VIII, 565. — *Maly's Jahresb. für Thierchemie* III, p. 160) étudie avec beaucoup de soins cette propriété de la pepsine. Krasilnikoff avait indiqué en 1864 la dialyse comme moyen de purifier la pepsine. Hammarsten eut maintes fois l'occasion de répéter ces expériences; mais comme il prolongeait la dialyse pendant 8 jours et même pendant 14 jours, il devait, afin d'éviter le développement des microorganismes, moisissures et autres, maintenir l'acidité de la liqueur et par conséquent remplacer l'acide au fur et à mesure qu'il était éliminé par la dialyse.

En renouvelant le liquide extérieur tous les jours, réunissant tous ces liquides et les ramenant par évaporation à la température du corps ou dans le vide, à un petit volume, il obtient un liquide qui ne renferme que des traces de pepsine. Le liquide contenu dans le dialyseur présente au contraire un pouvoir peptique très énergique.

Ces faits étant en contradiction avec les expériences de von Wittich, Hammarsten reprit les expériences.

Les recherches furent faites avec des solutions acides de pepsine contenant des proportions variables de pepsine et d'acide, la température de la dialyse variant de 5° à 18°.

Les dialyseurs employés furent fabriqués avec 3 sortes de papier parchemin. Chaque jour, le liquide extérieur

était enlevé, évaporé à une douce chaleur ou dans le vide et éprouvé quant à ses propriétés peptiques sur la fibrine. Les résultats concordèrent avec ceux de la première série : dans aucun cas le liquide extérieur ne contient de pepsine, le dialyseur étant irréprochable, c'est-à-dire absolument sans trous. Toutefois, les expériences d'Hammarsten n'étaient pas la répétition exacte de celles de von Wittich. Hammarsten introduisait dans son dialyseur une solution acide de pepsine et plongeait le dialyseur dans l'eau distillée. Von Wittich introduisait dans le dialyseur une solution glycinée de pepsine et plongeait le dialyseur dans l'eau acidulée. Hammarsten crut donc devoir répéter les expériences de von Wittich telles que cet auteur les avait faites, et, même ainsi, il put constater, après une dialyse de 72 heures, que le liquide extérieur n'avait acquis aucune propriété peptique. Dans une dernière série d'expériences, Hammarsten répéta les expériences de von Wittich sur la dialyse de la pepsine en présence d'eau contenant des flocons de fibrine. Il ne put constater aucune dialyse, aucune fixation de pepsine par la fibrine, même lorsque le liquide extérieur était acidulé.

G. Wolffhügel (*Ueber Pepsin und Fibrinverdauung ohne Pepsin*, — Pflüger's Archiv, Vol. VII, p. 188) reprit de son côté, sous la direction de Kühne, les expériences sur la diffusibilité de la pepsine et obtint des résultats différents de ceux de von Wittich.

Les expériences de diffusion étaient faites soit avec le dialyseur de Graham, soit avec l'appareil à diffusion de Kroecker. Le liquide extérieur était de l'eau ou de l'acide chlorhydrique à 4 pour 1000 ou de l'acide nitrique, contenant ou ne contenant pas de flocons de fibrine. Le liquide soumis à la dialyse était soit un extrait glyciné de la muqueuse du fundus gastrique, soit une macération de muqueuse gastrique dans l'acide chlorhydrique à 4 pour 1000

ou dans l'acide nitrique. Après une dialyse de 24 à 48 heures faite à la température du laboratoire, le liquide extérieur était examiné. On le faisait agir sur de la fibrine en présence de 4 pour 1000 d'acide chlorhydrique à la température de 40° et on notait les résultats obtenus au bout de 20 heures dans ce mélange de fibrine et d'acide chlorhydrique à 4 pour 1000. Dans aucun cas on ne put reconnaître la diffusion de la pepsine.

Plusieurs physiologistes ont utilisé cette propriété que possède la pepsine de ne pas dialyser ou de dialyser avec une extrême difficulté, pour purifier cette enzyme en la débarrassant des matières dialysables et notamment des matières salines qui peuvent la souiller.

Maly (dans *Chemische Zusammensetzung u. physiologische Bedeutung der Peptone*. — Pflüger's Archiv, Vol. IX, page 592, 1874) purifie ainsi la pepsine : Il prend une muqueuse gastrique de porc, la fait macérer dans l'acide phosphorique dilué, précipite la liqueur de macération par l'eau de chaux de façon à entraîner la pepsine avec le précipité de phosphate de chaux. Ce précipité est redissous au moyen d'acide chlorhydrique dilué et ce liquide est introduit dans un dialyseur plongeant dans une certaine quantité d'eau qu'on renouvelle jusqu'à ce que tous les sels soient éliminés ; ce dont on s'assure en constatant que l'eau extérieure ne présente plus les réactions de l'acide chlorhydrique et de l'acide phosphorique. Dans le liquide intérieur, il reste une solution de pepsine très active, tout en étant très pauvre en éléments fixes. Dans un cas, par exemple, la liqueur ne contenait que 0,05 pour 100 de résidu fixe.

Sundberg (*Ein Betrag zur Kenntniss des Pepsins* — Zeitschrift für physiologische Chemie, Vol. IX, p. 319) emploie également la dialyse pour débarrasser ses solutions de pepsine des substances diffusibles qu'elles contiennent.

Kühne (*Ueber das Trypsin* — Verhandlung. d. nat.-med. Vereins, Heidelberg, N. F. I, p. 194, 1876) a proposé la méthode suivante pour obtenir une trypsine pure. Un extrait aqueux de pancréas est précipité par l'alcool et épuisé par l'alcool absolu, puis redissous et additionné de 1 pour 100 d'acide acétique. On sépare le précipité ainsi produit : on alcalinise par le carbonate de soude : on enlève le nouveau précipité formé ; on évapore partiellement pour éliminer la plus grande partie de la tyrosine ; — enfin on soumet la liqueur qui reste à la dialyse pour achever la purification de l'enzyme.

Il convient enfin de signaler quelques indications rencontrées çà et là se rapportant à la question qui nous occupe.

Paschutin (dans *Versuche mit Fermenten welche Stärke und Röhrzucker in Traubenzucker verwandeln*. — Maly's Jahresbericht für Thierchemie, 1871, p. 304) compare la diffusibilité de la diastase amylolytique et de l'invertine à travers la muqueuse intestinale. Il constate que la diastase amylolytique diffuse facilement, tandis que l'invertine diffuse d'une façon presque inappréciable.

Hoppe-Seyler (*Handbuch d. physiolog. und patholog.-chem. Analyse*, 6te Auflage, p. 297) dit que la diastase amylolytique diffuse ou filtre à travers les membranes animales ou le papier parchemin sans grande difficulté.

Brown et Heron (*Beiträge zur Geschichte der Stärke und der Verwandlungen derselben*. — Liebig's Annalen, Vol. 199, p. 165) disent que si on filtre sur porcelaine dégourdie un extrait de malt, on obtient une liqueur qui a perdu toute propriété diastasique.

Bourquelot, au contraire (*Les ferments solubles*, Soc. d'édit. scientifiques. Paris, 1896), dit que si l'on fait passer la

solution d'un ferment à travers un filtre en terre poreuse, une partie, mais une partie seulement du ferment est retenue.

Hammarsten, enfin, dit que d'une façon générale les enzymes ne semblent pas diffusibles (*Lehrbuch d. physiologischen Chemie*. 3^{te} Auflage, p. 10. Wiesbaden, 1895).

La question de la dialysabilité des enzymes méritait donc d'être reprise puisque les expériences et les conclusions des auteurs ne sont pas concordantes. Elle méritait surtout d'être reprise, parce qu'on pouvait espérer obtenir ainsi des résultats importants pouvant donner des renseignements utiles sur la constitution des enzymes où la nature de leur substratum.

Les expériences qui ont été précédemment résumées, sans résoudre d'une façon définitive la question de la dialysabilité des enzymes, nous montrent que les enzymes ne sont pas facilement ou rapidement dialysables. Il est donc indispensable de faire des dialyses prolongées si l'on veut obtenir des résultats suffisamment nets pour poser des conclusions certaines. Mais les expériences de dialyse prolongées présentent dans le cas des enzymes un grave écueil : on sait que les enzymes sont contenues dans des liqueurs organiques capables de se putréfier ; or, les agents de la putréfaction peuvent détruire les enzymes ou en fabriquer. Il faut donc de toute nécessité se placer dans des conditions telles que le développement des organismes de la putréfaction soit impossible. En second lieu, il est nécessaire d'employer pour la dialyse des appareils absolument parfaits, ne présentant pas les moindres trous pouvant livrer passage mécanique au liquide soumis à la dialyse. Il fallait donc employer une méthode de vérification des dialyseurs très parfaite.

Procédé permettant la dialyse aseptique des solutions d'enzymes.

Les solutions d'enzymes, alors même qu'elles ont été débarrassées par purifications répétées de la plus grande partie des impuretés qu'elles renferment, contiennent toujours des matières organiques et salines capables d'entretenir la vie de microorganismes. Ce sont des liqueurs putrescibles. Or, on sait que les microorganismes de la putréfaction, et d'une façon plus générale tous les microorganismes, fabriquent des enzymes très semblables, sinon identiques à celles fabriquées par les êtres supérieurs.

C'est ainsi que, pour ne citer que quelques exemples, les microbes de la putréfaction fabriquent de la trypsine et de la diastase amylolytique ; c'est ainsi que d'autres microbes se développant dans le lait fabriquent du labferment, d'après M. Duclaux.

Les expériences de dialyse des enzymes doivent donc être faites dans des liqueurs aseptiques à l'origine, aseptiques pendant toute la durée de la dialyse. A cet effet, il convient d'ajouter à ces solutions d'enzymes une substance antiseptique ; mais le choix de cette substance n'est pas indifférent. En effet, parmi les différentes substances dont le pouvoir antiseptique a été mis en évidence et qui sont entrées dans la pratique, il en est un certain nombre qui détruisent ou insolubilisent les enzymes. Les substances à réaction acide, par exemple, détruisent rapidement la trypsine et aussi la ptyaline à des doses où elles sont à peine antiseptiques ; -- le sublimé, cet excellent antiseptique, n'est pas utilisable, parce qu'il possède la propriété de précipiter les enzymes, etc.

Il convenait d'employer un antiseptique qui fût sans action sur les enzymes elles-mêmes, sans action sur les transformations chimiques produites par ces enzymes et si possible dialysable. — Un tel antiseptique aurait le triple avantage suivant : 1° Il ne modifierait pas la puissance diastatique des solutions en expérience, condition indispensable pour ne pas dissimuler la présence des petites quantités d'enzymes qui pourraient dialyser; 2° il permettrait de rechercher dans le liquide de dialyse la présence de l'enzyme sans qu'il soit nécessaire d'éliminer l'agent antiseptique, ce qui entraîne en général des manipulations longues et dangereuses pour la conservation de l'enzyme ; 3° il pénétrerait dans toute l'épaisseur du dialyseur et réaliserait ainsi une asepsie parfaite de toutes les parties du système de dialyse. Le fluorure de sodium répond à cette triple indication.

Arthus et Huber (*Ferments solubles et ferments figurés*. Archiv. de physiologie, 1892, p. 651) ont montré que le fluorure de sodium à la dose de 1 pour 100 arrête instantanément et définitivement les fermentations vitales sans suspendre les fermentations par enzymes.

Le fluorure de sodium à la dose de 1 pour 100 empêche la putréfaction du lait, du sang, des transsudats, de l'urine et en général de tous les liquides et tissus organiques même les plus putrescibles, tels que le pancréas, le foie, etc. Par contre, il ne détruit ni la Ptyaline ou la diastase du malt, ni la pepsine, ni la trypsine, ni l'invertine ; les fermentations amylolytique, peptique, tryptique, etc., s'accomplissent normalement dans des liqueurs additionnées de fluorure de sodium à 1 pour 100.

Ajoutons que le fluorure de sodium dialyse avec une grande facilité.

Pour réaliser la dialyse aseptique des enzymes, on a donc procédé de la façon suivante : Dans le dialyseur, on a

introduit la solution d'enzyme dans l'eau fluorée à 1 %, et on a plongé le dialyseur dans une solution de fluorure de sodium à 1 %.

Par excès de précaution, dans quelques unes des expériences, tout au moins, on s'est attaché à maintenir pendant toute la durée des expériences les liqueurs à une température peu élevée, bien qu'en présence du fluorure de sodium cette condition ne soit pas nécessaire pour la conservation d'une asepsie rigoureuse.

2.

Procédé de vérification des appareils dialyseurs.

Toutes les expériences de dialyse ont été faites avec les boyaux de papier parchemin fabriqués par Brandegger d'Elwangen, utilisés d'abord par Kühne, et dont l'emploi tend de plus en plus à se généraliser. Ces boyaux présentent un double avantage : ils permettent d'avoir une fermeture bien parfaite, ce qui était difficile à obtenir avec les anciens appareils de dialyse ; ils offrent une surface de dialyse énorme pour un petit volume intérieur, condition éminemment favorable à la rapidité de la dialyse.

Pour vérifier le boyau dialyseur, on introduit un certain volume d'eau dans le boyau et, en faisant passer cette eau d'un segment du boyau dans le segment voisin, on s'assure que des gouttelettes de liquide n'apparaissent pas à la surface extérieure du boyau. En opérant ainsi, on met en évidence la présence des trous et on peut éliminer les parties imparfaites du boyau dialyseur. Mais il n'est pas certain que cette vérification soit suffisante pour reconnaître la présence de très petits orifices pouvant cependant livrer passage à une certaine quantité de liquide pendant une dialyse prolongée.

Le seul moyen de vérifier parfaitement un boyau dialyseur, ou en général un dialyseur quelconque, consiste à introduire dans ce dialyseur une solution d'une substance non dialysable et facile à reconnaître.

Nous avons pensé à utiliser les matières colorantes, et en particulier les matières fortement colorantes sous une petite masse, telles que les couleurs d'aniline. Nous avons fait des solutions aqueuses des matières colorantes suivantes : vert malachite, tropéoline oo, rouge congo, éosine, fuchsine, rouge de magdala, violet de méthyle ; nous avons introduit chacune de ces solutions dans un boyau dialyseur et nous avons plongé celui-ci dans de l'eau distillée.

Au bout de douze heures, tous les liquides extérieurs étaient fortement colorés. Par conséquent, aucune de ces matières colorantes ne pouvait répondre à l'emploi indiqué.

On peut employer par contre une solution d'empois d'amidon. Nous nous sommes assurés par un essai direct qu'avec un boyau dialyseur bien parfait le liquide extérieur ne contient pas d'amidon en quantité appréciable, même après une dialyse de 8 jours. Or, il est facile de reconnaître l'empois d'amidon dans une liqueur : il suffit de faire l'essai de la réaction iodée, réaction assez sensible.

On peut employer une solution albumineuse : les substances albuminoïdes ne dialysent pas, et nous possédons certains réactifs capables de déceler dans une liqueur de très petites quantités de ces substances : tels sont par exemple le ferrocyanure de potassium et l'acide acétique, le tannin et l'acide acétique, etc.

Enfin, on peut employer le procédé depuis longtemps en usage chez le professeur Kühne à l'Université d'Heidelberg. Ce procédé est fondé sur l'indialysabilité absolue de la matière colorante du sang.

Ce dernier procédé présente l'avantage de ne pas né-

cessiter l'emploi d'un réactif pour reconnaître dans le liquide extérieur la présence de la substance révélatrice : un simple examen suffit. La matière colorante du sang jouit d'un pouvoir tinctorial intense : de très petites quantités de cette matière suffisent à teinter une grande masse de liquide de la façon la plus évidente.

Nous avons commencé par vérifier de nouveau ce fait en employant non pas une solution d'oxyhémoglobine, mais du sang laqué, c'est-à-dire du sang dans lequel la matière colorante s'est dissoute dans le sérum. On sait qu'entre autres procédés pour laquer le sang, on peut employer la dilution : le sang se laque quand on l'additionne de 2 volumes d'eau distillée. Nous avons donc pris du sang défibriné de bœuf ou du sang défibriné de porc ; nous l'avons additionné de 2 volumes d'eau et nous avons obtenu une belle liqueur transparente rouge cerise foncé. Nous avons ajouté à ce liquide la moitié de son volume d'une solution de fluorure de sodium à 3 pour 100, afin d'obtenir une liqueur non putrescible, et nous l'avons introduit dans un boyau dialyseur. Ce boyau a été plongé dans une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100 et le tout abandonné dans le laboratoire pendant deux semaines. Le liquide extérieur est resté parfaitement incolore ; on ne vit pas la moindre teinte rouge.

Lorsque le boyau dialyseur présente un petit trou, il n'en est plus de même ; le liquide extérieur devient coloré, surtout si l'on prend soin de soulever un peu le boyau dialyseur de façon que la surface du liquide qu'il contient soit de 2 à 3 centimètres plus élevée que celle du liquide extérieur. On voit en général dans ces conditions un petit filet de liqueur rouge sourdre à travers la paroi du dialyseur et s'écouler vers le fond du liquide extérieur.

Voici donc quel fut le procédé adopté pour la vérification des dialyseurs : Lorsque l'expérience de dialyse des so-

lutions diastasiques était terminée, on remplaçait dans ce dialyseur le liquide diastatique par du sang défibriné laqué et fluoré, et on plongeait le dialyseur ainsi chargé dans une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. On soulevait le dialyseur de façon que le liquide intérieur s'élevât à quelques centimètres, à 2 ou 3 centimètres, au-dessus du niveau du liquide extérieur et on abandonnait le tout dans le laboratoire pendant 10 à 12 jours. Si le liquide extérieur était absolument incolore au bout de ce temps, on considérait l'expérience de dialyse de l'enzyme comme faite dans de bonnes conditions. Si, au contraire, le liquide extérieur se colorait, (la coloration apparaît vite dans le cas où le tube a des trous) on rejetait l'expérience de dialyse d'enzymes faite avec le boyau imparfait.

I.

Expériences sur l'Invertine.

Les expériences ont été faites avec l'invertine de levure de bière, tantôt avec de l'eau de levure, tantôt avec de l'invertine préparée suivant les procédés classiques.

De la levure de bière fraîche, fournie par une brasserie de Fribourg, est additionnée d'une petite quantité d'eau et agitée avec cette eau. Après 24 heures de contact à la température du laboratoire, on jette sur le filtre : la levure est retenue et il filtre un liquide transparent presque complètement incolore. Ce liquide constitue ce que nous appelons l'eau de levure. Il possède un pouvoir inversif très énergique, c'est-à-dire il est très riche en invertine.

On mélange 100 centimètres cubes de cette eau de levure et 100 centimètres cubes d'une solution aqueuse de fluorure de sodium à 2 pour 100 ; on obtient ainsi de l'eau de levure fluorée à 1 pour 100 et par conséquent imputrescible.

On introduit ces 200 centimètres cubes dans un tube dialyseur et on plonge ce dernier dans un cylindre contenant 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. On a choisi un cylindre d'assez petit diamètre pour que le liquide extérieur atteigne au moins le niveau du liquide intérieur -- c'est là une précaution qui sera toujours prise dans les expériences suivantes ; on le constate ici une fois pour toutes.

On abandonne dans le laboratoire à une température de 15 à 20° pendant 7 jours.

Au bout de ce temps, on mélange volumes égaux du liquide extérieur au dialyseur et d'une solution de saccharose à 10 pour 100 dans le fluorure de sodium à 1 pour 100.

On maintient ce mélange pendant 24 heures à la température de 37°, et on constate que la saccharose a été, au moins en partie, intervertie, le liquide réduisant la liqueur de Fehling. Toutefois, l'essai ainsi fait prête à la critique ; en effet, rien ne prouve *a priori* que la saccharose ne sera pas modifiée par le fluorure de sodium lui-même ; rien ne prouve que le liquide extérieur au dialyseur ne contient pas quelque agent, qui n'est pas une enzyme, capable d'intervertir la saccharose.

Les essais suivants sont au contraire absolument démonstratifs.

On prépare les mélanges suivants :

- a) 25 centimètres cubes d'une solution de saccharose à 10 pour 100, fluorée à 1 pour 100.

25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

- b) 25 centimètres cubes de la même solution fluorée de saccharose.

25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.

- c) 25 centimètres cubes de la même solution fluorée de saccharose.

25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur préalablement bouilli (on prend 25 centimètres cubes du liquide extérieur, on l'introduit dans un petit ballon et on fait bouillir pendant 5 minutes ; on ajoute de l'eau distillée pour ramener au volume primitif, en remplaçant l'eau chassée par l'ébullition.)

- d) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.

25 centimètres cubes de fluorure de sodium en solution aqueuse à 1 pour 100.

On maintient ces mélanges à 37° pendant 24 heures. On les examine alors au point de vue de leur pouvoir réducteur.

Les mélanges **a**, **c**, **d** ne réduisent aucunement la liqueur de Fehling ; le mélange **b** réduit très abondamment. D'où cette conclusion ? Le liquide de dialyse extérieur au dialyseur contient un agent capable d'intervertir la saccharose ; cet agent n'est pas le fluorure de sodium, puisque le mélange **a** ne réduit pas ; c'est un agent qui est détruit par l'ébullition, puisque le mélange **c** ne réduit pas ; le liquide de dialyse extérieur au dialyseur ne contenait pas lui-même de substance réductrice, ou de substance transformable en substance réductrice par un séjour de 24 heures à 37° en présence de 1 pour 100 de fluorure de sodium,

puisque le mélange **d** ne réduit pas. L'invertine a donc dialysé dans les conditions où l'expérience a été réalisée.

On s'assure alors par la méthode du sang laqué que le dialyseur est parfait. Après une dialyse de quelques jours, le liquide extérieur est absolument incolore.

Cette vérification est faite pour chaque expérience ; nous la notons ici une fois pour toutes.

On prépare de l'invertine de levure de bière. A cet effet, on met de la levure de bière fraîche à macérer dans une petite quantité d'eau, et on maintient la macération pendant 4 jours à la température du laboratoire 15 à 20°, en ayant soin de remettre la levure en suspension par agitations répétées. On jette sur un filtre de papier ; le filtrat est clair, mais assez fortement coloré. On l'additionne de 4 volumes d'alcool à 95 pour 100. Il se forme immédiatement un louche.

On laisse en repos pendant 12 heures à la température du laboratoire. On décante la plus grande partie de l'alcool et on jette sur un petit filtre le précipité floconneux qui s'est déposé au fond du vase. On le lave sur le filtre avec de l'alcool à 95 pour 100 et on laisse bien égoutter. On dessèche alors dans le vide en présence d'acide sulfurique concentré le filtre et le précipité qu'il supporte. Il reste sur le filtre un précipité vitreux très fortement coloré en brun, l'invertine brute, dont il sera fait usage pour les expériences suivantes.

On prend une petite quantité de cette invertine brute, on la broie dans un mortier avec une petite quantité d'eau fluorée à 1 pour 100, puis on ajoute de la solution fluorée à 1 pour 100, de façon à obtenir 200 centimètres cubes. On laisse macérer 20 heures à la température ordinaire, puis on jette sur un filtre.

Le liquide filtré est introduit dans un dialyseur en boyau, et ce dernier plongé dans un cylindre contenant 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. La dialyse se poursuit à la température de 15°.

Après 36 heures de dialyse, on prend 100 centimètres cubes du liquide extérieur et on les remplace par 100 centimètres cubes de la solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. Ce liquide prélevé constituera notre solution A.

On laisse la dialyse se prolonger pendant 8 jours, et on recueille le liquide extérieur qui constitue la solution B.

Avec ces deux solutions on fait les mêmes essais que dans l'expérience précédente.

- a) 25 centimètres de cubes solution fluorée à 1 pour 100 de saccharose à 10 pour 100.
25 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100.
- b) 25 centimètres cubes solution fluorée de saccharose.
25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.
- c) 25 centimètres cubes solution fluorée de saccharose.
25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieure au dialyseur, soumis à une ébullition de 5 minutes sans variation de volume.
- d) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.
25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

I. Essais avec la solution A.

On laisse les mélanges à l'étuve à 40° pendant 4 jours et on essaie la réduction de la liqueur de Fehling par les liqueurs a, b, c, d.

Il n'y a pas de réduction avec les mélanges a, c, d. Au contraire, le mélange **b** donne une réduction de la solution cupro-potassique. Mais cette réduction est extrêmement faible, bien que parfaitement nette si l'on emploie une très petite quantité de liqueur de Fehling.

Par conséquent, nous pouvons conclure de cette expérience que l'invertine a dialysé déjà après 36 heures, mais en quantité infiniment petite.

II. *Essais avec la solution B.*

Les mélanges a, b, c, d correspondants sont maintenus à l'étuve à 40° pendant 24 heures. On constate au bout de ce temps que le mélange **b** réduit abondamment la liqueur de Fehling, tandis que les autres mélanges sont absolument inactifs.

L'invertine a donc dialysé en quantité beaucoup plus grande après 8 jours qu'après 36 heures. L'invertine dialyse, mais difficilement et lentement.

On a vérifié les dialyseurs au moyen du sang laqué.

Pour se rendre compte de la rapidité de la dialyse de l'invertine, on a, dans l'expérience suivante, comparé l'activité invertine du liquide intérieur et celle du liquide extérieur de dialyse après 20 heures, après 4 jours et après 8 jours de dialyse.

On prépare comme dans la précédente expérience une solution d'invertine dans le fluorure de sodium à 1 pour 100. On en fait 100 centimètres cubes par addition d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

La dialyse se fait à la température du laboratoire.

Après 20 heures de dialyse, on prélève 10 centimètres cubes du liquide intérieur et 10 centimètres cubes du liquide

extérieur au dialyseur. On ajoute ces liquides chacun à 50 centimètres cubes d'une solution de saccharose à 10 pour 100 dans le fluorure de sodium à 1 pour 100.

- a } 50 centimètres cubes solution fluorée de saccharose.
 } 10 centimètres cubes du liquide intérieur au dialyseur.
- b } 50 centimètres cubes solution fluorée de saccharose.
 } 10 centimètres cubes du liquide extérieur au dialyseur.

On abandonne ces mélanges pendant 24 heures à la température du laboratoire.

On détermine alors le pouvoir réducteur de ces mélanges avec la liqueur de Fehling ferrocyanurée à 2 pour 100. (On sait que l'addition du ferrocyanure empêche la précipitation de l'oxyde cuivreux et permet de faire le dosage par l'observation d'un simple changement de coloration.)

5 centimètres cubes de liqueur de Fehling ferrocyanurée sont réduits par 2,^{cc}5 du mélange **a** — ou par 47,5^{cc} du mélange **b**.

Après une dialyse de 4 jours, on fait un nouveau prélèvement de 20 centimètres cubes du liquide extérieur.

On prépare deux mélanges **a** et deux mélanges **b**, comme ci-dessus, en ajoutant 10 centimètres cubes de l'un des liquides prélevés à 50 centimètres cubes d'une solution fluorée de saccharose, la même que dans l'expérience précédente. Deux de ces mélanges, un mélange **a** et un mélange **b** sont conservés dans le laboratoire ; les deux autres sont mis à 40°. On laisse 24 heures et on détermine le pouvoir réducteur des mélanges.

Pour les mélanges laissés dans le laboratoire, on trouve que :

5 centimètres cubes de liqueur de Fehling ferrocyanurée sont réduits par 2,6^{cc} du mélange **a** et par 41,0^{cc} du mélange **b**.

Pour les mélanges mis à 40°, on constate que :

5 centimètres cubes de la liqueur de Fehling ferrocyanurée sont réduits par 2,5^{cc} du mélange a et par 32,5^{cc} du mélange b.

Après une dialyse de 8 jours, on fait de nouveau un mélange a et un mélange b. On laisse ces mélanges pendant 24 heures à la température du laboratoire et on détermine le pouvoir réducteur. On constate ainsi que 5 centimètres cubes de liqueur de Fehling ferrocyanurée sont réduits par 2,8^{cc} du mélange a et par 29,5^{cc} du mélange b.

Si nous admettons que la quantité de substance transformée est proportionnelle, toutes autres conditions égales, à la quantité de l'invertine agissante, nous pourrons, au moyen des données précédentes, connaître les quantités de cette enzyme ayant dialysé.

Ces quantités sont, à un facteur constant près, les suivantes :

Le liquide extérieur contient :

après 20 heures	0,021
» 4 jours	0,024
» 8 jours	0,034

d'invertine.

Le liquide intérieur en contient :

après 20 heures	0,400
» 4 jours	0,384
» 8 jours	0,357

Si la somme des quantités de ferment contenu à un moment donné dans le liquide intérieur et dans le liquide extérieur n'est pas constante, c'est que nous avons fait une hypothèse, qui n'est pas absolument exacte, en supposant

que les quantités d'enzymes sont proportionnelles aux quantités de substances transformées.

Si nous calculons maintenant le rapport des quantités de ferment contenu dans le liquide extérieur et dans le liquide intérieur, nous trouvons :

après 20 heures	21 ou 0,052
	400
» 4 jours	24 ou 0,062
	384
» 8 jours	34 ou 0,095
	357

Cette expérience nous montre que le ferment soluble invertine dialyse avec une extrême lenteur.

—

Nous avons recherché si l'addition de substances colloïdes à la solution d'enzyme empêcherait la dialyse de celle-ci. On sait que les enzymes se fixent assez facilement sur les substances colloïdes, sont entraînées par les précipités floconneux, etc.

A cet effet, nous avons préparé une solution d'invertine de levure dans le fluorure de sodium à 1 pour 100, d'après le mode précédemment indiqué, et nous avons ajouté à cette solution une solution fluorée d'amidon, d'albumine ou de caséum.

Pour préparer la solution d'amidon, nous avons fait bouillir de l'amidon finement pulvérisé dans une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100 pendant 25 à 30 minutes, et nous avons filtré sur coton de verre.

Pour préparer la solution d'albumine, nous avons mélangé volumes é aux de blancs d'œufs de poule frais

et d'une solution de fluorure de sodium à 2 pour 100, et nous avons filtré sur papier.

Pour préparer la solution de caséum, nous avons caséifié du lait de vache à 40° par la présure, agité le liquide pendant la prise pour obtenir une précipitation grumeleuse et lavé ces grumeaux à l'eau à plusieurs reprises. Nous avons soumis ensuite ces grumeaux à l'action prolongée d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100 à la température d'ébullition, et finalement nous avons jeté sur des filtres de papier. La solution ainsi obtenue était très riche en caséum ; par addition d'acide acétique, elle donnait un très abondant précipité floconneux ; on peut admettre qu'elle contenait sensiblement (peut-être cependant un peu moins) la même proportion de caséine que le lait de vache origine.

Les mélanges de la solution d'invertine et des liqueurs colloïdes sont introduits dans des dialyseurs, et ceux-ci sont plongés dans des solutions de fluorure de sodium à 1 pour 100. Le tout est conservé à la température du laboratoire pendant 10 jours.

Au bout de ce temps, on examine le liquide extérieur. On constate que le liquide extérieur au tube à amidon ne donne pas la réaction iodée de l'amidon et que les autres liquides extérieurs ne donnent pas les réactions des substances protéiques (réaction xanthoprotéique et réaction du biuret, — précipitation par un acide minéral, par le ferrocyanure de potassium acétique, etc.). Les substances considérées, amidon, albumine et caséum n'ont pas traversé nos dialyseurs. Ces mêmes liquides extérieurs ont été examinés au point de vue de leur teneur en invertine. On a fait cet examen de la façon suivante :

A 50 centimètres cubes d'une solution fluorée de saccharose pure, on ajoute 20 centimètres cubes des

liquides considérés. On constate que ces mélanges, après 48 heures à 40°, donnent une réduction très nette de la liqueur de Fehling.

A 50 centimètres cubes de la même solution fluorée de saccharose, on ajoute 20 centimètres cubes de chacun des liquides extérieurs préalablement soumis à une ébullition de quelques minutes. Après 48 heures de séjour à 40°, ces mélanges ne présentent aucune propriété réductrice. Donc l'agent actif de nos solutions extérieures est bien l'enzyme que nous y cherchions, puisque cet agent est détruit à la température d'ébullition. Donc, des substances colloïdes comme l'amidon, l'albumine, le caséum ne s'opposent pas à la dialyse des enzymes.

Cette expérience était intéressante à faire à un autre point de vue; elle nous montrait que nos dialyseurs présentent bien l'imperméabilité désirable aux substances albuminoïdes, etc.

II.

Expériences sur la diastase amylolytique du malt.

Nous avons employé pour ces expériences la diastase de Grüber.

Pour faire des solutions de cette enzyme, nous broyons la poudre diastasique dans un mortier en présence d'une petite quantité de liquide, et lorsque la poudre était ainsi transformée en une bouillie très claire, nous versions celle-ci dans une grande quantité de liquide. Après une

macération de 24 heures à la température du laboratoire, nous jetions sur un filtre de papier pour retenir les particules insolubles.

Nous avons préparé ainsi une solution fluorée au moyen de 2 grammes de diastase et de 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. Cette solution est introduite dans un boyau dialyseur, et celui-ci plongé dans 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

On abandonne la dialyse dans le laboratoire pendant 8 jours à la température de 15 à 20°.

On prépare une solution d'amidon dans le fluorure de sodium à 1 pour 100. On fait bouillir de l'amidon en poudre dans une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100 pendant 30 minutes; puis on filtre sur coton de verre pour retenir les gros grumeaux d'amidon. Une filtration sur papier d'une solution d'amidon est en général très longue, et le liquide filtré est de coutume assez pauvre en substance dissoute. On prépare alors les mélanges suivants :

a) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amidon.

25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

b) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amidon.

25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.

c) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amidon.

25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur qu'on a préalablement fait bouillir 5 minutes, en compensant, par addition convenable d'eau, les pertes dues à l'évaporation.

d) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.

25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

On abandonne ces mélanges à la température du laboratoire pendant 8 jours. On examine alors la réaction de l'iode. Les mélanges **a**, **c**, **d**, donnent avec la plus grande netteté la réaction de l'iodure d'amidon. Le mélange **b** ne donne pas la moindre trace d'une coloration bleue par l'iode. Donc, dans le mélange **b** et dans celui-là seulement, l'amidon a été transformé. Par conséquent, cette transformation n'est pas due à l'action du fluorure de sodium, puisque le mélange **a** donne la réaction de l'amidon ; elle n'est pas due à une substance contenue dans le liquide extérieur capable de masquer la réaction de l'iodure d'amidon. L'amidon a été transformé en **b** par un agent détruit à l'ébullition, puisque le mélange **c** n'a pas été transformé.

Nous devons conclure de cette expérience que le ferment amylolytique du malt a dialysé à travers le boyau de papier parchemin, dans les conditions où cette expérience a été réalisée.

On dissout, comme il a été précédemment indiqué, 4 grammes de diastase de Grüber dans 200 centimètres cubes d'une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100, et on met à dialyser en présence de 200 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100.

Après 36 heures de dialyse à la température du laboratoire, on prélève 100 centimètres cubes du liquide extérieur au dialyseur, et on le remplace par 100 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100. On a la solution A.

On laisse la dialyse continuer pendant encore 6 1/2

jours, la durée totale de la dialyse ayant ainsi été de 8 jours entiers. On prélève de nouveau 100 centimètres cubes du liquide extérieur, ce qui constitue la solution B.

Avec ces solutions A et B, on prépare des mélanges a, b, c, d, analogues à ceux dont la composition a été indiquée dans le rapport de la précédente expérience. On met ces mélanges à l'étuve à 40°, et on examine au bout d'un temps plus ou moins long la réaction de ces mélanges vis-à-vis de l'iode.

Après 4 jours de séjour à l'étuve, les mélanges a, c, d, correspondant aux solutions A et B, donnent la réaction de l'iodure d'amidon. Ils ne contiennent donc (en quantité appréciable tout au moins) aucun agent capable de saccharifier l'amidon.

Les mélanges b, au contraire, ne donnent plus la réaction de l'iodure d'amidon : celui qui correspond à la solution A au bout de 36 heures environ ; celui qui correspond à la solution B, déjà au bout de 12 heures (peut-être même plus tôt).

D'où cette conclusion que la diastase amylolytique du malt dialyse : après 36 heures, dans les conditions de l'expérience, il y a déjà une dialyse appréciable ; au bout de 8 jours, la dialyse est plus avancée ; le pouvoir amylolytique du liquide extérieur au dialyseur est beaucoup plus grand qu'après 36 heures.

On dissout 8 grammes de diastase de Grüber dans 400 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100, et on met à dialyser en présence de 400 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100 à la température du laboratoire.

Après 20 heures, on prélève 10 centimètres cubes du liquide intérieur et 10 centimètres cubes du liquide exté-

rieur. On ajoute à chacun de ces prélèvements 25 centimètres cubes d'une solution d'empois d'amidon dans le fluorure de sodium à 1 pour 100 et on met à l'étuve à 40°.

On répète ces prélèvements et on fait des mélanges analogues aux précédents, après 4 jours et après 8 jours de dialyse. On examine alors la rapidité de la disparition de la réaction de l'iodure d'amidon dans ces mélanges. Nous ne donnons pas ici de chiffres, parce qu'il est difficile de connaître exactement le moment de la disparition de cette réaction ; pendant les dernières phases de la saccharification de l'amidon, on observe, en effet, une coloration violacée de plus en plus atténuée.

On peut toutefois indiquer les conclusions qui se dégagent avec la plus grande netteté des observations qu'on a faites : l'activité amylolytique du liquide extérieur au dialyseur croît à mesure que la dialyse se prolonge ; le rapport des activités amylolytiques du liquide extérieur et du liquide intérieur va, par conséquent, en augmentant avec la durée de la dialyse. L'activité amylolytique du liquide intérieur est, même après 8 jours de dialyse, incomparablement plus grande que celle du liquide extérieur.

Si donc la diastase amylolytique du malt peut dialyser, elle ne dialyse qu'avec une grande lenteur et une extrême difficulté.

On prépare une solution de diastase du malt en dissolvant 4 grammes de la diastase de Grüber dans 200 centimètres cubes d'une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100. De cette solution, on fait deux parts égales qu'on mélange : la première avec 100 centimètres cubes d'une solution d'albumine dans le fluorure de sodium à 1 pour 100 ; la seconde avec 100 centimètres cubes d'une solution de caséum dans le fluorure de sodium à 1 pour 100.

On introduit chacun de ces mélanges dans un tube dialyseur, et on plonge celui-ci dans 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. On laisse la dialyse se prolonger pendant 10 jours à la température du laboratoire.

Au bout de ce temps, on constate, comme on l'a déjà fait à propos des expériences sur l'invertine, que le liquide extérieur ne donne pas la moindre réaction des substances protéiques: l'albumine ou le caséum n'ont pas dialysé.

Par contre, en mélangeant 25 centimètres cubes du liquide extérieur au dialyseur et 25 centimètres cubes d'une solution d'empois d'amidon dans le fluorure de sodium à 1 pour 100 et maintenant ce mélange à l'étuve à 40°, on constate la transformation de l'amidon, et, par conséquent, on conclut à la dialyse de la diastase.

Donc, la diastase amylolytique du malt dialyse même lorsqu'elle se trouve en présence de substances colloïdes, telles que l'albumine et le caséum.

Notons dès maintenant que les résultats des expériences dont nous venons de parler sur la diastase amylolytique du malt sont absolument semblables aux résultats des expériences de la première série, entreprises pour étudier la dialysabilité de l'invertine de levure de bière. Les deux enzymes se comportent vis-à-vis du dialyseur d'une façon tout-à-fait identique.

III.

Expériences sur l'émulsine.

On dissout $\frac{1}{2}$ gramme d'émulsine dans 200 centimètres cubes d'une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100; on introduit cette solution filtrée dans un boyau dialyseur, et on plonge ce boyau dans 200 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100. La dialyse se prolonge pendant 8 jours à la température du laboratoire, soit 15 à 20°.

On prépare, d'autre part, une solution contenant 2 grammes d'amygdaline pour 100 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100, et on fait les mélanges suivants :

- a) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amygdaline.
25 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100.
- b) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amygdaline.
25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.
- c) 25 centimètres cubes de la solution fluorée d'amygdaline.
25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur, bouilli pendant 5 minutes.
- d) 25 centimètres cubes du liquide extérieur de dialyse.
25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

On maintient ces 4 mélanges à l'étuve à 40°, en les introduisant dans de petits flacons bouchés. Après 24 heures,

on examine l'odeur des divers mélanges: le mélange **b** a une très forte odeur d'amandes amères; les autres mélanges, **a**, **c**, **d**, sont absolument inodores. On laisse encore 7 jours à l'étuve ces trois derniers mélanges, et on les examine chaque jour; il ne se produit à aucun moment d'odeur d'amandes amères.

On peut en conclure que l'émulsine a dialysé dans les conditions de l'expérience.

On répète la même expérience et on cherche dans le liquide extérieur de dialyse la présence de l'émulsine, après une dialyse de 36 heures, puis après une dialyse de 8 jours.

On fait les mêmes essais que dans l'expérience précédente. On constate ainsi qu'après 36 heures de dialyse, le liquide extérieur contient déjà une petite quantité d'émulsine; après 8 jours de dialyse, le liquide de dialyse extérieur contient une quantité d'émulsine notablement plus grande; la réaction de l'émulsine se manifestant avec une plus grande rapidité, toutes autres conditions étant égales.

On prépare une solution d'émulsine dans le fluorure de sodium à 1 pour 100, et on mélange quantités égales, soit 100 centimètres cubes de cette solution, respectivement avec 100 centimètres cubes d'une solution fluorée d'amidon, avec 100 centimètres cubes d'une solution fluorée d'albumine, avec 100 centimètres cubes d'une solution fluorée de caséum. On introduit ces mélanges dans des boyaux dialyseurs, qu'on plonge dans 200 centimètres cubes de fluorure de sodium à 1 pour 100.

On laisse la dialyse se poursuivre pendant 10 jours à la température du laboratoire. On constate alors que les liquides extérieurs ne renferment ni amidon, ni albumine,

ni caséum ; mais renferment tous de l'émulsine, car tous sont capables de transformer l'amygdaline.

L'émulsine se comporte ainsi, au point de vue de la dialyse, comme l'invertine et comme la diastase amylolytique du malt.

IV.

Expériences avec la trypsine.

Pour les expériences sur la trypsine, on a employé la solution glycérinée de pancréatine de Grüber.

On fait le mélange suivant :

- 20 centimètres cubes de pancréatine glycérinée de Grüber,
- 80 centimètres cubes d'eau,
- 100 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 2 pour 100.

On introduit ce mélange dans un tube dialyseur, et on met à dialyser en présence de 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100, à la température du laboratoire, soit 15 à 20°. La dialyse dure pendant 8 jours.

D'autre part, on a préparé de la fibrine de bœuf qu'on a bien lavée à l'eau courante, puis qu'on a fait bouillir et qu'on a conservée pendant quelques jours dans l'alcool fort.

Avant d'employer cette fibrine, on la lave bien à l'eau distillée pour la débarrasser de l'alcool qui l'imprègne.

On prépare alors les mélanges suivants :

- a) 25 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.
2 grammes de fibrine.
- b) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.
2 grammes de fibrine.
- c) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur, préalablement bouilli.
2 grammes de fibrine.
- d) 25 centimètres cubes du liquide de dialyse extérieur au dialyseur.

On introduit ces mélanges à l'étuve à 40° pendant 24 heures, et on examine la liqueur au point de vue de sa teneur en substances albuminoïdes dissoutes. Dans les mélanges **a**, **c**, **d**, on ne peut faire apparaître la réaction du biuret. Au contraire, le mélange **b** donne très nettement la réaction du biuret.

D'ailleurs, la fibrine qui y est contenue apparaît comme rongée et déjà légèrement dissoute.

Donc la trypsine de la pancréatine de Grüber a traversé le dialyseur en quantité appréciable.

On fait le mélange suivant :

- 40 centimètres cubes de pancréatine glycinée de Grüber ;
- 60 centimètres cubes d'eau ;
- 100 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 2 pour 100.

On plonge le dialyseur contenant ce mélange dans 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100. On laisse dans le laboratoire à la température de 15 à 20°.

Après 36 heures de dialyse, on prélève 100 centimètres cubes du liquide extérieur de dialyse, et on le remplace par 100 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

Après 8 jours de dialyse, on prélève de nouveau une quantité suffisante du liquide extérieur pour faire les essais.

On prépare avec chacune de ces deux solutions A et B des mélanges a, b, c, d, comme dans la précédente expérience.

Pour les mélanges faits avec la solution A, on constate après 4 jours de séjour à l'étuve à 40° que seul le mélange **b** donne une coloration du biuret légère, mais nette ; la fibrine est un peu dissociée et quelques petits fragments, détachés de la masse, troublent légèrement le liquide quand on agite.

Pour les mélanges faits avec la solution B, le mélange **b** seul présente la réaction du biuret ; les autres mélanges ne la donnent pas. Dans ce cas, déjà après 24 heures de séjour à l'étuve à 40°, la fibrine de **b** est nettement attaquée et la coloration du biuret est très marquée.

Donc la trypsine a déjà dialysé après 36 heures, mais en quantité extrêmement faible. La quantité de trypsine dialysée augmente, lorsque la dialyse est prolongée.

V.

Expériences avec la pepsine.

On prépare le mélange suivant :

- 40 centimètres cubes de pepsine glycerinée de Grüber ;
- 160 centimètres cubes d'eau ;
- 200 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 2 pour 100.

On introduit dans un tube dialyseur, et on plonge celui-ci dans 400 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 1 pour 100.

On laisse la dialyse se poursuivre pendant 8 jours à la température du laboratoire 15 à 20°.

On prélève une partie du liquide extérieur, et on prépare les mélanges suivants :

- a) 50 centimètres cubes d'eau fluorée à 1 pour 100,
10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 1 pour 100.
2 grammes de fibrine bouillie (comme celle qui a servi aux expériences sur la trypsine) ;
- b) 50 centimètres cubes du liquide extérieur de dialyse,
10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 1 pour 100,
2 grammes de fibrine bouillie ;
- c) 50 centimètres cubes du liquide extérieur de dialyse,
bouilli pendant 10 minutes,
10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 1 pour 100,
2 grammes de fibrine bouillie.

On met pendant 8 heures à 40°; on constate avec le mélange **b** une réaction très nette du biuret; avec les autres mélanges, à peine un indice de la coloration du biuret. (On sait que l'acide chlorhydrique dilué peut par lui-même dissoudre très lentement la fibrine.

D'où cette conclusion: la pepsine a dialysé dans les conditions de notre expérience.

Avec une solution fluorée de pepsine identique à celle qui a servi dans la précédente expérience, on a fait une dialyse en présence de fluorure de sodium à 1 pour 100. La dialyse est faite à la température du laboratoire 15 à 20° et dure 10 jours. Au bout de ce temps, on prélève 50 centimètres cubes du liquide intérieur et 50 centimètres cubes du liquide extérieur de dialyse, on les acidule par l'acide chlorhydrique à 2 pour 100, et on plonge dans chacun d'eux environ 2 grammes de fibrine coagulée par la chaleur. On maintient à l'étuve à 40 pendant 24 heures.

Le mélange contenant le liquide intérieur au dialyseur a totalement dissous la fibrine qu'il contenait, tandis que l'autre mélange ne fait que commencer à l'attaquer: le liquide donne une réaction du biuret non douteuse, mais la fibrine est à peine attaquée.

Donc la pepsine, comme les autres enzymes que nous avons examinées à ce point de vue, ne dialyse que lentement et difficilement.

Les enzymes (invertine, ferment amylolytique du malt, émulsine, trypsine, pepsine) dialysent. Mais cette dialyse est lente, difficile; il faudrait un temps considérable pour que les liquides intérieur et extérieur renfermassent la même quantité d'enzyme.

Les enzymes, en résumé, sont dialysables, mais très difficilement dialysables.

CONSÉQUENCES



Les physiologistes ne sont pas d'accord sur la nature des enzymes : les uns en font des substances matérielles ayant une composition et une constitution chimique déterminées, agissant grâce à la structure de leur molécule ; les autres, beaucoup moins nombreux, il est vrai, en font des propriétés de substances matérielles, indépendantes dans une certaine mesure de la constitution chimique de ces dernières.

Mais que les enzymes soient des substances chimiquement définissables, ou que ce soient de simples propriétés de substances, peu importe. Il y a toujours là ou une substance matérielle ou un substratum matériel. Quelle est la nature de ce substratum ? Ici encore les avis sont partagés, et les conclusions des divers auteurs sont souvent incompatibles entre elles. Pour les uns, les enzymes sont des substances albuminoïdes ; pour d'autres, ce sont des substances non albuminoïdes ; pour d'autres, ce sont des protéoses ; pour d'autres, ce sont des hydrates de carbone voisins de la gomme animale, etc.

Mais les auteurs qui ont cherché à élucider la nature des enzymes n'ont pas procédé d'une façon absolument inattaquable. Partant de liqueurs ou de tissus doués de propriétés diastasiques, ils ont précipité par des réactifs appropriés les substances ou une partie des substances

contenues dans ces liqueurs ou tissus ; puis ils ont procédé à l'élimination des substances étrangères non diastasiques par une série de dissolutions et de précipitations au moyen de réactifs divers. Finalement, ils ont obtenu un produit qu'ils considèrent comme pur ou tout au moins comme purifié, et dont ils étudient la composition centésimale ou les réactions principales. Mais quel est le critérium de la pureté ? Pourquoi, après un certain nombre de dissolutions et de précipitations, les auteurs admettent-ils que le produit est pur ? Est-ce parce que sa composition centésimale et ses propriétés sont invariables ? Mais cela ne prouve pas qu'on a affaire à une substance chimiquement pure. Il se peut que ce soit un mélange de plusieurs substances. Et alors, ce qu'on étudie, ce sont peut-être bien les propriétés et la constitution des impuretés, non celles de l'enzyme elle-même.

Dans ce travail, nous avons, au contraire, étudié une propriété de l'enzyme même. Sans tenir compte de la composition chimique du liquide extérieur de dialyse, nous y avons décelé la présence de l'enzyme. Nous avons pu dire, par conséquent, que *les enzymes, soit la substance enzyme, soit la substance porte-enzyme, sont dialysables, mais difficilement dialysables.*

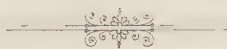
Or, nous savons que les substances albuminoïdes, proprement dites, sont indialysables ; nous tirerons donc de nos expériences cette conséquence que *les enzymes ne sauraient être des substances albuminoïdes, ou que les substrata matériels des enzymes ne sauraient être des substances albuminoïdes.*

Les protéoses, au contraire, sont dialysables, en général difficilement dialysables. Elles présentent ainsi un caractère commun avec les enzymes. En devons-nous conclure que les enzymes sont des protéoses ? En aucune façon, car les protéoses ne sont pas les seules substances dialysables

et difficilement dialysables. Nous dirons seulement que *rien, dans les expériences que nous avons faites, ne vient infirmer l'hypothèse de la nature protéose des enzymes.*

Nous rappellerons que plusieurs auteurs ont prétendu que les enzymes doivent être des protéoses. C'est ainsi que Lœw (*Pflüger's Archiv*, vol. 27, p. 203 et vol. 36, p. 170), étudiant plus particulièrement le ferment protéolytique du pancréas, admet que ce ferment est une protéose. Il se fonde sur les propriétés de précipitation des solutions de ce ferment préparé et purifié par un procédé assez compliqué. On constate la réaction colorée de Millon, la réaction du biuret, la précipitation par les acides phosphomolybdique et phosphotungstique, par le tannin acétique, la non coagulation par la chaleur.

Nos expériences nous permettent de dire seulement que *les enzymes partagent avec les protéoses la propriété de dialyser et de dialyser difficilement.*



CURRICULUM VITÆ



Je suis né en 1865 à Piatigorsk, dans le Caucase russe; je suis fils de Bagdassar Chodschajew et de Elisabeth Chodschajew, son épouse; j'appartiens à la confession arménienne grégorienne.

Je suis entré en 1876 au gymnase classique; j'y suis resté 4 années. En 1880, je suis entré à l'Ecole réelle (*Realschule*) de Rostow sur le Don, pour y suivre les leçons des deux classes supérieures. Ces études m'ont permis de faire mon service militaire en qualité de volontaire de 6 mois (bataillon de réserve du Caucase 1884-85).

En 1885, après avoir terminé le service militaire, je suis entré en seconde à l'Ecole préparatoire au polytechnicum à Riga, et j'y suis resté jusqu'en 1888. Entré au polytechnicum de Riga, j'ai suivi les leçons de la section de chimie technique. En 1893, j'ai quitté le polytechnicum pour venir à l'Université de Zurich, où je suis resté pendant le semestre d'été. Au commencement du semestre d'hiver 1893-94, je me suis rendu à Leipzig et j'y suis resté 7 semestres. En mai 1897 je suis venu à l'Université de Fribourg, où j'ai terminé mes études au mois de mars 1898.

J'ai suivi les cours et fréquenté les laboratoires de MM. les professeurs Liewenthal, Kieseritzki, Glasenapp, Grübler, Bischoff, Groenberg, Gottfried, Mohrmann, Pfuhl, Abeljanz, Kleiner, Wislicenus, Paul, Siegfried, Arthus, de Kowalski, Bistrzycki, de Girard.

Je prie tous mes maîtres d'agréer l'expression de toute ma reconnaissance.



